

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-315603

(43)公開日 平成6年(1994)11月15日

(51)Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
B 01 D 29/01 101 K 7519-2 J
G 01 N 1/00 1/10 B 7519-2 J
8925-4D B 01 D 29/04 510 E
8925-4D 530 Z
審査請求 未請求 請求項の数11 OL (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-233817

(22)出願日 平成5年(1993)9月20日

(31)優先権主張番号 92308536.9

(32)優先日 1992年9月18日

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 590001751

アマーシャム・インターナショナル・ビー
エルシー

AMERSHAM INTERNATIO
NAL PUBLIC LIMITED
COMPANY

イギリス国エッチビー7.9エヌエイ, バ
ッキンガムシャー, リトル・チャルフОН
ト, アマーシャム・ブレイス(番地なし)

(74)代理人 弁理士 湯浅 耕三(外6名)

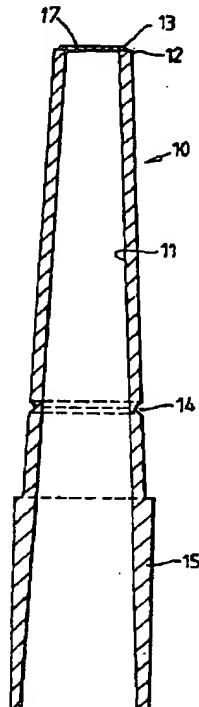
最終頁に続く

(54)【発明の名称】アフィニティ一分離のためのデバイスと方法

(57)【要約】

【目的】流体中に存在する成分の捕捉に用いるデバイスを提供する。

【構成】マイクロピペットに嵌合しうる後方末端15と、ピペットチップを横切って広がり捕捉すべき成分を結合するようにした膜17を有する前方末端とを有するピペットチップ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 流体をピペットチップ中に吸い上げるための、ピペットに嵌まるべく造られたオープンの後方端部；

(b) オープンの前方端部；および

(c) ピペットチップの前方端部にて、あるいはピペットチップの前方端部に隣接して、ピペットチップを横切って広がっている少なくとも1つの膜；を有するピペットチップを含む、流体中に存在している成分を捕捉するためのデバイス。

【請求項2】 ピペットチップの後方端部が、マイクロピペットに対して摩擦嵌め合いとなるよう内部がテーパー付けされている、請求項1記載のデバイス。

【請求項3】 前記膜または各膜が、繊維の織物メッシュまたは不織メッシュである、請求項1または2に記載のデバイス。

【請求項4】 前記膜または各膜が、流体中に存在している成分を結合すべく造られている、請求項1～3のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項5】 前記膜または各膜が、結合すべき成分の特異的な結合パートナーを組み込んでいる、請求項4記載のデバイス。

【請求項6】 前記膜が前記ピペットチップの前方端部に密着固定される、請求項1～5のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項7】 前記ピペットチップが脆性のプラスチック材料であり、その両端部間に強度を弱めるための円周ラインを有していて、これによりピペットチップを前記ラインに沿って手で破断することができる、請求項1～6のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項8】 強度を弱めるための前記円周ラインが外部溝によって与えられる、請求項7記載のデバイス。

【請求項9】 前記ピペットチップがポリカーボネート材料である、請求項1～8のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項10】 前記ピペットチップが円錐状であって、その直径が前方端部に向かって減少している、請求項1～9のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項11】 前記ピペットチップが縦軸を有し、前記膜が前記縦軸に対して斜めに据え付けられている、請求項1～10のいずれか一項に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アフィニティ一分離のためのデバイス (device) と方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 生物科学の分野では、複雑な混合物からある1種類の成分を単離するのに、所望する物質がもつ特異的な性質の1つまたはそれらの組み合わせを使用した種々の分離法が広く

利用されている。これらの特性としては、大きさ、形状、電荷、疎水性、溶解性、および密度などがあり、いずれもクロマトグラフィーによる類別が可能である。一般にはこれらの特性は十分に特異的というわけではなく、したがって精製するためには一連の異なる順次的な分離操作を施さなければならない。どの工程を使用するの選択はしばしば経験的に決められる。新たな精製ルートを考案することは極めて骨の折れる作業であり、各選択はそれ自体の中に多くの変動要因を含んでいる。多くの生体物質のもつ不安定な性質のため、この選択は難しい処置であり、所望の物質が精製できると、それがすぐに分解する場合もある。

【0003】 これらの方法の1つはアフィニティーコロマトグラフィーである。このアフィニティーコロマトグラフィーでは、分離操作を施す上で、所望の物質の有するより特異的な性質が利用される。アフィニティーコロマトグラフィーには通常、分離を行う際の助けとなる特異的な結合能力が関与している。生物学的システムでは、本来備わっている機能（例えば、罹患しにくくする上での抗体／抗原相互作用、または細胞のシグナル伝達のためのレセプター／リガンド相互作用など）の一部としての特異的な結合を極めて日常的に利用する。この生物学的システムを分離法に利用すると一工程で100%の分離を得ることができるので、特に有効な方法である。こうした有効な分離法を使用する場合、分離操作にかかる際に、結合していないすべての汚染物質を高効率で除去することが大切である。好ましくは、一回の通過で汚染物の除去および所望の物質の捕捉に関して、100%の効率でなければならない。このためには、所望の物質とその結合パートナーとの間に極めて大きな相互作用があること、また非常に効率的な洗浄がなされることが必要となる。

【0004】 したがって、すべてのターゲット分子を捕捉するための充分な捕捉用分子 (capture molecules) が固相に保持されるような方法が必要とされる。このことは、ターゲット分子もしくはターゲット物質が結合部位に近づきやすく、そして結合していない部分をトラップしたり疑似相互作用させたりすることなく洗浄除去することのできるような方法において可能となる。

【0005】 アフィニティーコロマトグラフィー処理を実施する上で多くのフォーマットがある。いずれのフォーマットも、結合対の一方の側を固相に固定された状態で有するという一般的な特徴を共有している。フォーマットは、最も一般的には、カラムに詰められたビーズ材料からなる。所望の物質を含有した液体をビーズ上に、ビーズ周囲に、そして場合によってはビーズ内部に流して捕捉用物質 (capture entity) と接触させ、次いで洗浄用溶液をビーズ表面上に流すことによって汚染物を洗浄することができる。洗浄工程の強弱

は、洗浄溶液の性質（例えば、温度、イオン強度、pH、および溶媒の混合など）によって影響を受けることがある。

【0006】ビーズは、捕捉用物質が固定化される表面を最大にするので、多くの場合において好ましい選択である。

【0007】一般には、主要な要件は、ターゲット物質を含有した流体を固相に通してコンパートメント間の最大接触を可能にするよう、捕捉用物質が結合することのできる不溶性物質に対するものである。さらに固相は通常、充分な捕捉用物質が有効に作用しうるよう、できるだけ大きな表面積を必要とする。ほとんどの場合、アフィニティーコロマトグラフィー処理の目的は、複雑な混合物から純粋な形態でターゲット物質を取り除くこと、次いで捕捉用物質を除去することなく、捕捉用物質からターゲット物質を溶離することにある。これが可能となるためには、結合パートナーに損傷を引き起こすことなく結合力に打ち勝つような条件が見いだされなければならない。

【0008】最近、特に分子生物学の分野では、以前より数倍も感度の高い方法が見いだされており、したがってこのような多量のサンプルを出発物質として必要としない。さらに、固相に結合させたままで順次処理を施すことができる。分子生物学は、ダウンストリームのプロセシングおよび生体内変換に関して急速に発展しつつある分野であり、しばしば固相に保持された物質によって酵素作用的に化学変性が施される。

【0009】近年、特に抗体の精製用に、濾過膜 (filtration membrane) をベースにしたアフィニティーコロマトグラフィーに対するいくつかのフォーマットが提唱されている。最も一般的には濾過カートリッジのフォーマット（生物学分野の当技術者にはよく知られているものである）が使用される。これは使い捨てでもしくは再使用可能なカセットからなり、カセットの中に濾過膜のディスクが据え付けられている。

【0010】濾過膜は、プラスチックメッシュによりカセット内にて両側に支持され、シリンジに接続されるべく設計されたノズルと、捕集容器に向かうべく設計された出口が、カセットの上部表面と下部表面に設けられている。これらのカセットは、場合によってはその設計構造において、膜を横切る流体の相互作用を最大にするために液体流れのチャンネルを含む（米国特許第4,690,757号）。

【0011】最近の開発によれば、既に永久的に結合させた捕捉用物質、または通常の誘導用に化学的に活性化させた形での捕捉用物質を使用した新たな技術が見いだされている。ディスクは通常直径が約5cmであり、カラムと同じくらいの高い結合能力を有しているとされている。このことは、一度に1~50mlの溶液という多量のサンプルを施すためのシリンジと共に使用しても問

題はない。

【0012】前述したように、最近の開発傾向では、より少ないサンプル量、より高い感度での検出、および特に分子生物学における增幅技術に重点が注がれている。生物学においては、多量のサンプルは、得るのが困難であり、またサンプル源である生物学的物質にかなりの混乱 (derangement) を引き起す。このことは、サンプルを繰り返し採取して傾向や反応を追跡する場合には、特に当てはまることがある。さらにサンプルが多量であると、処理するのが一層遅くなり、また不安定な生物学的物質が処理時に好ましくない環境にさらされる。

【0013】前述したように、現在のアフィニティープロセスは、捕捉用物質からターゲット物質を取り除くことを最終工程として含んでいる。このことはつまり、所望の精製物質に損傷を与えることなく結合をこわすような条件を経験的に見いだす必要があるということである。これは例えば、強い結合であることが特に望ましい抗体の場合には極めて困難なことである。結合が強くなればなるほど、溶離液はより一層変性しやすくなるのは言うまでもない。場合によっては、良好な条件のセットを見いだすために、溶離液の数多くの組み合わせを検討する必要がある。しかしながら、いかなる組み合わせからも良好な結果が得られていない場合もしばしばある。

【0014】分子精製物 (molecular purifications) だけでなく、細胞もアフィニティープロセスに使用される。これは、細胞の異なった特性に基づいて種々の形態をとることができる。通常は（但し、いつもというわけではない）さらなる分析のために、細胞をプロセスから無傷のまま回収しなければならない。分離はしばしば、抗体を得ることのできる細胞表面分子 (cell surface molecules) の存在に基づいて行われる。これは、サイズ測定や密度測定と組み合わせることもできる。細胞をアフィニティー精製する方法としては“蛍光活性化フローサイトメトリー”があり、これは1つ以上の細胞表面マーカーの存在とサイズとを組み合わせることができる。細胞精製の問題は、その不安定さのために厳しいものがあり、抗体による選定がなされた場合、選定された細胞は標識を付けた状態で使用しなければならない。

【0015】科学の多くの分野では、結合に対して本来もっている親和性を利用する。遺伝学においては通常、核酸の相補性が分析方法の基礎として利用される。例えば、mRNAは端部に、チミジンヌクレオチドの列に結合することのできる、アデニンヌクレオチドのテールを常に有しているという事実によって単離される。

【0016】特定遺伝子のヌクレオチド配列は、相補的なヌクレオチド配列によって捕捉することができる。これらのハイブリッドは、溶離剤のイオン強度を低下させて、DNAストランド間に本来有している電荷による反

発を起こさせることによって極めて容易に取り除くことができる。

【0017】前述したように、損傷を与えることなく取り除く溶離条件は見いだすことができない場合もある。しかしながら、それが所望の活性を所定の場所に固定化するリンカーとして作用することができるような状況にて捕捉がなされ、したがってその後の工程をその場で行うことができる場合、こうしたことは利点に転換させることができる。例えば、これは、化学合成に固定化酵素を使用する生体内変換という新しい科学における酵素反応であると言える。

【0018】ターゲット物質を分離することが必須である場合、最終的な手段は、それ自体は溶媒に溶解するが、ターゲット物質に損傷を与えないような膜材料を使用することである。しかしながらこの場合は、捕捉用物質(*capturing material*)も放出される。

【0019】捕捉用物質の固相へのカップリングは、プロセスの汚染を引き起こす捕捉用物質の漏出という問題を防ぐために、共有結合によるものであることが多い。

【0020】ターゲット物質の分離が困難であるか又は不需要であれば、分析作業をその場で行うことができる。生物学的分析の多くは膜上で行うことができる。例えば、ある物質が膜上に固定化され、他の物質を捕捉するために使用される。さらにラベル付けされた結合物質を使用するとき、ある物質が存在するかどうかは、蛍光マーカー、比色定量用酵素マーカー、または放射能ラベルを使用して明らかにできる。これらは、目視によって、機械によって、または顕微鏡分析によって確認することができ、あるいはまた適切な装置によりカウントすることもできる。膜上に存在することの必要性は、局在に関する情報を与える点だけでなく、効率的な洗浄が可能な点にある。

【0021】現在では、酵素反応、遺伝子增幅反応、および化学合成等の他のプロセスも、膜上で行われている。

【0022】分離の結果は（特にそれが細胞を含んでいる場合）、直接的な観察によって確認しなければならない。この直接的な観察は、細胞がまだ良好な状態にあるかどうか、また分離が“クリーン”に見えるかどうか等の情報を得るために使用される。場合によっては、異なったルート（例えば、特異的な染色または酵素活性）によってアイデンティティーを実証するために、分離した細胞に関してさらなる特異的な試験を行わなければならない。セルソーター(*cell sorter*)が使用された場合は、得られた細胞を調べることができる。カラムが使用された場合は、細胞を溶離して観察しなければならない。しかしながら、膜が使用された場合は、ほとんどの膜が半透明であるので直接目視して調べることができる。

【0023】捕捉をベースにした手法のほとんどは、依然としてカラムフォーマットを使用している。カラムフォーマットは、サンプルをマトリックス上にゆっくりとしたたらせること、また一連の洗浄工程にてマトリックス上にしたたらせることによって洗浄を行うことを必要とする。洗浄と溶離を改良するために、種々のpH、イオン強度、および疎水性を有する溶媒の勾配(*gradient*)を利用することが多い。

【0024】さらに、少量の洗浄溶液を数回に分けて使用するほうが、大量の洗浄溶液を一度に使用するよりはあるかに効率的である。カラムフォーマットの場合、数種類の洗浄溶液を少量にて使用すると、どうしても処理時間が長くなる。

【0025】特に、結合親和性が弱く、接触を最大にするために捕捉表面上へのサンプル溶液の循環を必要とする場合、これらのプロセスは長い時間を要することがある。こうした長い時間中に、多くの成分が劣化して変性が起こり、したがってこれらのプロセスの多くは現在、冷却された部屋の中で行われている。これらは作業するのにあまり好ましくない環境であり、問題点を一部しか解決していない。

【0026】これに対する1つの方策がHPLC法の開発である。HPLC法は、液体を加圧下で移送するので処理が速い。しかしながらこれらのシステムはコストがかかり、物質を高圧だけでなく温度にさらすことになる。

【0027】膜による捕捉プロセスは、一般には処理がより速く、したがって不安定な物質に対しては好ましいプロセスであるが、デッドスペースの問題を引き起こしやすい。このことはつまり、極めて少量のサンプルは容易に使用できること、また溶離した物質の濃度がより低いことを意味する。

【0028】カートリッジが内蔵式なので、液体が充分に入っているかどうかを調べることは簡単ではなく、この結果、空気が膜を通過して、最少容積の試料を濃縮しようとする試みにおいて、膜が部分的に乾燥される。さらに、膜は内蔵され、そして支持されているので、光顕微鏡または電子顕微鏡による明視化のために膜を取り出すのは困難である。同様に、その後の反応に対してカートリッジを容易に使用することはできない。ある種のカートリッジは分解することができ、したがって膜を取り出すことができる。この真の目的はカートリッジを再使用することにあるが、一般には膜にいくらかの損傷が生じてしまう。

【0029】いくつかのサンプル中には、所望の成分が少量または少数で存在する。この結果、捕捉用物質上に大量のサンプルを通過させる必要がある。こうしたことは、処理に長い時間がかかることに加えて、液体流れのプロセスが、場合によってはそれまで結合していた成分の除去を引き起こす恐れがある、というさらなる

欠点を有する。こうした問題の深刻度は結合の性質や強さによって異なるが、生物学的に重要な親和性はとらえがたいものである場合が多く、この精製方法がこれらの理由のために達成できないケースがたくさんある。

【0030】これらの問題を解決するための他のルートは、固相の量を増大させることによって、有効な捕捉用パートナー (capture partner) の量を増大させることである。この結果、流速はより遅くなり、反応時間はより長くなり、所望の物質の希釈度はより大きくなる。

【0031】こうしたタイプの精製のためのサンプルは、しばしば臨床サンプルであって伝染性があり、洗浄用や特に溶離剤用の化学物質も有害な性質をもっていることが多い。このような化学物質としては、有機溶媒、酸、イオン対分子、キレート形成剤、および洗浄剤などがある。カラムを使用する従来のプロセスは、作業者に害を及ぼすおそれがある。なぜなら、作業者は、しばしば相当量の有害物質を使用する全システムにさらされるからである。膜カートリッジデバイスはより優れているが、それでもまだ液体を噴出させる仕組みになっており、したがってこぼれたりエーロゾルになったりする可能性がある。

【0032】一度精製したターゲット物質の多くは、例えば電気泳動や反応性等のさらなる分析に使用される。引き続き行われるこれらの反応の殆どに対し、ターゲット物質（一般には量が限定されている）は高濃度であるのが好ましい。カラムと膜を含んだアフィニティーシステムの場合、溶離を行うと、サンプルが最大濃度未満にて捕集される。このことは、さらなる作業を施す前に濃縮を行わなければならないということをしばしば意味する。低い初期濃度の高度精製物質の濃縮は、極めて非効率的で、しばしば50%を越える損失を引き起こす。

【0033】これらの少量の希釈物質は、貯蔵時に簡単に変質するという欠点もこうむり、一般には他の分子（例えばウシ血清アルブミン）と混合して、その安定性を増大させなければならない。こうしたことは、第一にターゲット物質を精製するという目的の一部をだいなしにしてしまう。ターゲット物質はさらに、極めて不安定であって貯蔵容器の表面に吸着される。したがって、その防止のため毒性のあるシリコン化合物（シラン）による前処理が必要となる。

【0034】前述したように、殆どのクロマトグラフィー法は経験的に検討がなされ、多くの工程を含むことが多い。それらの考え方は、まず小さなスケールに関して種々の条件下で单一工程の個々の試験を行い、これによって工程のタイプと順序を最適化して引き続き行われる大スケール操作を考案するというものである。

【0035】このことは一般に、種々の多数の小さなカラムを造り、それらを平衡化し、単独および組み合わせて検討し、そして溶離液を分析して調べなければならぬ

い、ということを意味する。このようなプロセスにおいては、成分を検出できるようにするためには、成分を放射能ラベルすることがしばしば必要とされ、この結果、相当量の放射能廃棄物が生じる。これらの反応を行うための自動化されたシステムがあるが、これらのシステムは極めて高価であって且つ操作が複雑であり、得られた物質をさらに分析する必要がある。

【0036】チップの端部に分離物を得るという考え方 (concept of having a separation on the end of a tip) は、特許明細書No. WO 8809201において既に利用されている。しかしながらこの場合においては、チップが、2つのフリット (frit) 間にカラム材料を含んでおり、したがって小型のカラムである。カラムの使用法は、重力に基づく溶液流れによるものであり、これはカラム法に対して通常使用されているものである。

【0037】

【課題を解決するための手段】本発明は、

10 (a) 流体をピペットチップ中に吸い上げるための、ピペットに嵌まるべく造られたオープンの後方端部；
 (b) オープンの前方端部；および
 (c) ピペットチップの前方端部にて、あるいはピペットチップの前方端部に隣接して、ピペットチップを横切って広がっている少なくとも1つの膜；を有するピペットチップを含んだ、流体中に存在している成分を捕捉するためのデバイスを提供する。

【0038】膜は多孔質であるのが好ましい。なぜなら、流体が膜を通って、膜上に、あるいは膜の周囲に流れれてピペットチップに流れ込めることが必要だからである。膜は繊維の織物メッシュまたは不織メッシュであるのが好ましく、この「膜」という用語は、ばらばらまたは連続的である加工糸とフィラメントのいずれをも含むよう使用されている。膜は、織物メッシュ (mesh weave)、不織メッシュ、ニュークリアトラックをエッティングした膜 (nuclear track checked membrane)、または電解メッシュのいずれでもよい。種々の孔サイズの膜が可能である。膜はあまりにも大きくて孔を通過することができない粒子を40 流体から物理的に分離するための単なる通常のフィルターとして使用されているわけではないことを理解されたい。膜の孔サイズはむしろ、流体と膜との間の密な接触が確実に得られるよう選択される。孔サイズが大きいほど、膜に対する流体の通過は容易になるが、所望の成分に対する膜の捕捉効率は低くなる。

【0039】膜は、流体中に存在している成分と結合すべく、そしてこれによって前記成分を捕捉すべく造られているのが好ましい。例えば、膜は、結合すべき成分の特異的な結合パートナーを導入してもよい。膜は、捕捉用物質を組み込んでいてもよい。捕捉用物質としては、

イオン交換分子、親和性蛋白質（例えば、抗体やビオチン結合分子）、酵素、核酸、ヌクレオチドオリゴマー、細胞結合分子、およびキレート形成剤などがある。

【0040】1つの実施態様においては、膜は、例えば化学的相互作用、疎水性結合、物理的吸着、または電荷による相互作用によって、DNAを結合することのできる物質である。プラスチック材料へのDNAの結合は複雑であり、これらの現象の種々の組み合わせを含む。例えば、強く荷電したポリマー表面は、電荷による相互作用を起こしやすく、また荷電していないポリマー表面は疎水性結合を起こしやすい。

【0041】核捕捉特性 (nuclear capture properties) を有する多くの物質が知られており、例えば、ポリエステル、ポリアミド、ポリカーボネート、セルロース、ニトロセルロース、二フッ化ポリビニリデン、およびガラスなどがある。これとは別に、膜は、それが捕捉すべき成分を結合するような仕方で、化学的もしくは物理的に活性化することのできるいかなる材料からも造ることができる。捕捉用物質（例えば、抗体や他の特異的結合種）の膜上への固定化は、文献中に詳細に説明されている種々の化学的・物理的手段によって容易に行うことができる。

【0042】膜は、関与する特定の分離条件を考慮して選択される。例えば、膜は、引き続き行われる酵素反応や培養要件に対して抑制的とならないよう選択される。膜はさらに、非蛍光性、透明性、耐熱性、または耐薬品性を有するよう選択することができる。

【0043】適切に使用されている捕捉膜は、1, 5, 6および11μmのポリエステル織物膜、および1μmのナイロン織物膜である。1μmのポリエステル膜とナイロン膜が好ましい。好ましさの程度は小さくなるが、それなりに有効なものとしては、50μmと100μmのランダムメッシュのポリカーボネート膜、および5μmと10μmのトラックエッティングした (track etched) ポリエステル膜である。さらに、0.45μmのニトロセルロース膜やナイロン膜も適切に使用されているが、流量が少なくなり、したがって洗浄効率が低下する（実施例1を参照）。

【0044】所望の成分が膜の前方対向表面 (forward-facing surface) に捕捉されるというのが、本発明の利点である。ピペットチップの前方端部にまたはそれに隣接して膜が据え付けられている。すなわち、その後の処理、反応、または分析に対して容易に目視可能もしくはアクセス可能となるよう、前方端部に充分近く据え付けられている。膜は、ピペットチップの軸に関して直角、あるいは斜めの状態で（すなわち、ピペットチップの縦軸に関して直角ではない）、ピペットチップの前方端部に固定するのが好ましい。斜めの据え付けは、ある与えられたチップ直径に対して膜の表面積を増大させ、汚染された溶液にデバイスが挿入

されるときに、汚染を防止するのに有効である。これとは別に、膜を短いチューブ状部分の前方端部に据え付けることもでき、このとき前記チューブ状部分の後方端部は、本発明のピペットチップの前方端部に摩擦嵌め合いとなっている。このようにして、いくつかの膜を含んだいくつかのチューブ状部分をピペットチップに据え付けることができる。

【0045】第1の（あるいは一つだけの）膜は、ピペットチップの前方端部またはそれに隣接して固定するの

10 が好ましい。膜は、その後の処理が行えるよう、ピペットチップから剥離できるように造ることができる。しかしながらこの実施態様では、該ピペットチップで同じ膜または他の膜に取り替えることはできない。したがって、本発明のデバイスは、再使用可能よりむしろ使い捨てとなるよう設計されている。

【0046】これとは別に、固定用カラーによって膜をピペットチップの前方端部に固定することもできる。

【0047】ピペットチップは、好ましくはプラスチック材料で造られた一体成形構造物であるのが好ましい。

20 このときプラスチック材料は、オートクレーブ処理 (120°C, 20分) に耐えるだけでなく、95°Cと周囲温度との間の加熱と冷却の繰り返しにも耐えるものでなければならぬ。ピペットチップの製造においては、離型剤や可塑剤を使用してはならない。またプラスチック材料は、吸着による重要な成分の除去、あるいは化学的な抑制によって、PCR等の酵素反応を阻害してはならない。好ましいプラスチック膜としては、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエステル、およびPTFE等の膜がある。ポリカーボネートとポリエステルは、チューブが透明であるという利点を有する。好ましくは、ピペットチップは凍結融解試験にて破壊するようなものではない。

30 【0048】ピペットは通常、容量調節式または容量非調節式の使い捨てチップを有するマイクロピペットであり、ギルソン (Gilmson) やエッペンドルフ (Eppendorf) 等の会社により製造されていて、生物学に関する当技術者にはよく知られているものである。ピペットチップの後方端部は、マイクロピペットに対して摩擦嵌め合いとなるよう、内側に向かってテーパー付けされていることが望ましい。ピペットチップの後方端部は、外部の軸補強用リブを組み込んでもよい。

40 【0049】ピペットチップは好ましくは脆性のプラスチック材料であり、その端部間に強度を弱くするための円周ライン（例えば外部溝によって与えられる）を有しており、そのラインに沿ってチップを手で破断することができる。チップの前方端部の長さは、膜を備え、かつ、蓋を閉めることができるような仕方で、さらなるプロセシングのためのエッペンドルフチューブ中に挿入することができるよう選択することができる。ピペットチップは円錐形であるのが好ましく、このとき後方端

部はマイクロピペットに嵌まり込むようなサイズとなつており、ピペットチップは、その前方端部に向かって内径も外径も減少している。

【0050】ピペットチップの端部の直径が小さいと、極めて小量のサンプル中に膜を浸漬することができる。ピペットチップは、ピペットによってそこの引き入れられる流体を収容すべく造られており、したがってピペット自体のいかなる汚染も防止される。これにより、膜を通して液体をチップに吸い上げることができ、このとき力はほとんど必要ない。さらに、これにより、再び膜を通して液体を押し出すことができ、したがってサンプルと捕捉用パートナーとの相互作用は倍になる。このピペットティング・アップとピペットティング・ダウントは何回でも繰り返すことができ、したがってサンプルは、捕捉用物質と相互作用するチャンスが多い。ピペットティングのスピードは簡単に変えることができるし、あるいは極めて遅い速度の場合、チップを溶液中に入れたままにしておくこともできる。結合工程がいったん許容されると、チップは簡単に必要な数の洗浄溶液に移され、必要に応じて各回ごとにピペットティング・アップとピペットティング・ダウントが行われる。洗浄という観点からは、いくつかの連続した少量の洗浄のほうが、同じ量で一回洗浄するよりはるかに有効である。したがって本方法は、洗浄効果を最大にしつつ、洗浄溶液の必要量を最小限に抑える。洗浄のためのピペットティングは、場合によってはかなり激しく、また、回数が多いことがある。

【0051】特記すべき利点は、チップの端部に膜が存在すると、物質が主として膜の外部表面に付着するという点である。このことは、目視観察のために、効率的な溶離のために、その後の反応のために、あるいは例えば細胞性物質の場合、膜上にてその場で培養しつづけるために、重要なことである。

【0052】捕捉すべき成分を含有した流体の性質は、本発明にとって重要なことではない。流体は、例えば液体のような生物学的流体であってもよい。

【0053】場合によっては、流体が多くの不溶性物質を含有していることからあまりにも“汚れている (dirty)”ので、膜を通して吸い上げる工程が遅くなるかあるいは困難となる。この場合、ピペットチップを通して正圧または負圧を加えることなく、流体を膜の外表面に接触させることで充分である。流体がピペットチップと接触してかきませられるので、膜は所望の成分を捕捉する。次いでピペットチップを“汚れた”流体から取り出し、洗浄溶液中に浸漬する。洗浄溶液がピペットチップに吸い上げられ、膜を通して送り出される。通常は、こうした操作が数回行われる。

【0054】最適の精製を得るために（おそらくはその後の大スケールのスキームを得るために）多くの条件を試みる必要がある場合、多くの条件のトライアルを、速やかな連続操作で行うことができる。調製が多数の場

合、チップをマイクロピペットのマルチチャンネルバージョン (multi-channel version)（当技術者にはよく知られている）と共に使用することができる。これにより、8～12個の精製を同時にを行うことができる。膜末端のチップ (membrane-ended tips) は、マルチピペットに簡単に接続できるよう、一列にして接続させた状態で製造することができる。

【0055】特に困難な分離に対しては、あるいは同じ10サンプルから異なった成分を取り除く必要がある場合には、小さなスペーサーによって隔離された多くの層を使用することができる。これらの層のそれぞれは異なった形で調製することができ、したがってサンプルはそれらのすべてと接触し、これらの層を頭-尾の態様で組み立てることができる。サンプルが粒状であるか、あるいは汚染されている場合にはこれも有用であり、こうした望ましくない物質のいくらかを除去するよう第1の層を選定することができる。

【0056】これらの層を使用して、多数の特定の汚染20物を除去し、これにより異なる物質を同時に捕捉する2つ以上の層上にターゲット物質を捕捉することによって分離を改良するか、あるいはある物質を除去しつつ他の物質を捕捉することができる。これらの層は、“スロットから取り外す (unslotting)”ことによって処理後に分けることができる。

【0057】この様態は、保存剤または酵素インヒビターである物質や分子を付着した膜を含むよう拡張して、所望の物質を残存させることができる。それらはさらに、洗剤、界面活性剤、または抗菌剤を固相膜上に有することができ、これによってサンプルを汚染することなくそれらの活性を利用することができる。

【0058】これのさらなる変形は、酵素がその反応を行なうことができるよう、そして酵素をサンプルから除去してサンプルの汚染を防止できるよう、酵素活性を膜のあるセクションにもたせることである。場合によっては、これらのセクションを再使用のために保存することができる。

【0059】1992年9月18日付け提出の発明者らのヨーロッパ特許出願 92 308 537. 7 (タイトルは“捕捉法とデバイス”）について言及する。該発明は細胞の成分を分離する方法を説明しており、該方法は

a) 細胞質膜をわずかな割合の核膜と共に選択的に溶解させるよう（但しこのとき、大部分の細胞核は損傷を受けないままである）、全細胞を含有した流体を処理する工程；

b) 処理した流体を表面に施し、これによって溶解した細胞核からのDNAのメッシュを表面上に形成させ、無傷の細胞核を捕捉する工程；

c) 表面上のDNAメッシュを洗浄して、捕捉した細

胞核を他の細胞成分から分離する工程；を含む。

【0060】前記特許出願はさらに、該方法に使用するためのデバイスについて説明している。該発明のデバイスはその目的に極めて適しており、膜の前方対向表面が、処理した流体が上記工程b)において施される表面を構成している。しかしながらこの場合、膜は通常誘導化されない。

【0061】図1と2を参照すると、デバイスは、内腔(bore)11を有するピペットチップ10から成り、内腔11は、その後方端部からその前方端部12に向かっての長さに沿って直径が減少している。ピペットチップの前方端部フェースは、透過性膜17を取り付けるための環状ピップ(annular pip)13を有する。透過性膜17は内腔を横切って広がっており、捕捉すべき成分の性質にしたがって選択されている。本構造物においては、ピップは三角形の断面を有している。ピペットチップの壁体には、前方端部からの選定された距離に、円周溝14の形で強度を弱くするためのラインが形成されている。後方端部15においては、ピペットチップの外表面は円筒状であり、一連の軸強化用リブ16を有する。このリブにより、ピペットチップの後方端部を摩擦嵌め合いにてマイクロピペットの端部に固定することができる。ピペットチップは、透明で脆性の熱可塑性プラスチック材料で造られている。この目的のためには、ポリカーボネートが特に適している。

【0062】本デバイスを使用する場合、マイクロピペットにより膜を通して生物学的流体をピペットチップ中に吸い込み、このとき膜が流体中のある成分を捕捉する。次いで膜を通して洗浄溶液を吸い込むことによって、捕捉した成分を洗浄する。次いでピペットチップを円周溝14のところで破断し、ピペットチップの前方端部、膜、および捕捉された成分の一セットを標準的なエッペンドルフチューブ中に配置してさらなる処理を施す。エッペンドルフチューブの蓋が閉められるように、溝14をピペットチップの前方端部から18mmの距離に形成するのが特に有利である。

【0063】図3、4、および5は、ほぼ類似の実施態様を示している。図3では、捕捉膜17がピペットチップの前方端部12を横切って広がっている状態で示されている。ピペットチップにおいて、破断ポイント14と後方端部15との間にエアロゾルフィルター18が据え付けられている。このフィルターの目的は、マイクロピペットの先端が、捕捉膜を通して吸い上げられた生物学的流体で汚染されないようにすることである。

【0064】図4においては、ピペットチップは膜を有していない。チューブ状部分19が、その前方端部において膜20を有している。チューブ状部分19の後方端部は、ピペットチップの前方端部に対して摩擦嵌め合いとなっている。

【0065】図5においては、デバイスは、図3に示し

たもののに2つのチューブ状セクション19と21を有しており、これらが前方端部に対して押し込まれて摩擦嵌め合いとなっている。したがって、本デバイスは3つの膜(17, 20, 22)を有しており、生物学的流体はこれら3つの膜を順次通って吸い上げられる。

【0066】図6は、図3と類似のデバイスを示しており、エッペンドルフチューブ23中に挿入されている。本デバイスは外部円周ディスク24を含む。このディスクは、破断ポイント14のわずか前方に配置し、破断の際の支点として作用する。膜17は、逆流防止シールとしても作用する固定用カラー25によってピペットチップの前方端部に固定される。エッペンドルフチューブは、捕捉膜のさらなる処理のために、50μlの反応流体26を収容する。

【0067】使用時においては、ピペットチップの後方端部15に横向き(例えば、矢印27で示した方向)の圧力を加えて、ピペットチップを破断ポイントにて破断する。次いでピペットチップの後方端部を取り除き、エッペンドルフチューブの蓋28を閉め、必要に応じて捕捉膜17をさらに処理する。

【0068】実施例1

2種の蛋白質混合物からのチトクロムP450変異体のアフィニティー精製に対する膜チップの使用

a) チトクロムP450を含有した蛋白質混合物を、一連の分子量マーカーとして得た。これらは、各蛋白質に関して約1mg/mlの濃度の水溶液として得られ、P450(55kDa), オボアルブミン(46kDa), カルボニックアンヒドライゼ(30kDa), トリプシン阻害因子(21.5kDa), リゾチーム(14.3kDa), アブロチニン(6.5kDa), インシュリン鎖A(3.4kDa), およびインシュリン鎖B(2.3kDa)をトリスバッファー(Tris buffer)(pH 8.0)中に含む。

【0069】b) フェノバルビトンで処理したラット(Guengerich, F. P. and Martin M. V. Arch. Biochem. Biophys., 205, 365-379, 1980)を殺し、肝臓を取り出した。過剰発現したP450タンパク質を含むことが知られているミクロソームの抽出物を調製した(Guengerich, F. P. J. Biol. Chem. 252, 3970-3979, 1977)。この方法では、ホモジエナイゼーションと遠心分離工程を塩水中で連続的に行う。抽出物はいったん調製したら、必要になるまで-70°Cで貯蔵する。

【0070】チップは以下のように作製した：ナイロン強化したニトロセルロース膜を前方端部を横切った状態で取り付けて、上述したようにチップを作製した。P450に対するある程度精製したポリグローナル抗体(Ryan, D. E. and Levin, W.

Pharmac. Ther. 45, 15-23
9, 1990) の溶液 $100\mu\text{l}$ 中に浸漬することによって、抗体を膜の表面に付着させた。抗体は、 $10\text{mg}/\text{m}\text{l}$ ウシ血清アルブミンを含む、 100mM カーボネート緩衝液 (pH 9.0) 中に、 $10\text{mg}/\text{m}\text{l}$ の濃度で含まれているものを使用した。

【0071】これを溶液中で 15 分間保持し、リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中で過剰分を洗い落とし、塩水中 4°C で貯蔵して乾燥を防止した。

【0072】a) と b) における $10\mu\text{l}$ の蛋白質混合物を、リン酸塩緩衝液 (PBS) で $500\mu\text{l}$ に希釈した。

【0073】抗体被覆された膜が取り付けられている別のチップを使用して、抽出物を吸引したり押し出ししたりした。

【0074】吸引は 5 回繰り返した。次いでチップを $3 \times 5\text{m}\text{l}$ · PBS の洗浄溶液に移し、それぞれ一回の吸引と押し出しを行った。チップの端部から膜を剥がし、サンプルに PAGE 電気泳動のためのローディング・バッファ (loading buffer) を加えた。

【0075】SDS、DTT、グリセロール、およびプロモフェノールブルーを含有した $20\mu\text{l}$ のローディング・バッファ中で、サンプルを 2 分間沸騰させた。未処理のチップを通して吸引された抽出物、ならびに “チッピング (tipping)” 後の減少抽出物の対照サンプルを、等量のサンプルとローディング・バッファと一緒に 2 分間沸騰させることによって調製した。

【0076】 $10\mu\text{l}$ の各サンプルを変性用の 12% PAGE ゲル上で 100V にて 3 時間泳動し、引き続きクーマシーブルー固定液中でステイニング処理して蛋白質のバンドを明らかにした。

【0077】最初の 3 つのトラック (track) は混合物 A、すなわち 1) “チッピング” 後の混合物； 2) 抗体なしで “ブランク (blank)” チップを使用したときの “チッピング” 後の混合物； および 3) 抗体処理したチップによって抽出された物質；を示した。

【0078】これに続く 3 つのトラックは、5) “チッピング” 後の肝臓抽出物； 6) 抗体なしで “ブランク” チップを使用したときの “チッピング” 後の肝臓抽出物； 7) チップにより抽出された物質 (このトラックにおけるさらに他の物質は、チップ膜から溶離した抗体汚染物を表していると思われる。通常のやり方では、放射能ラベルした抽出物を使用してこれらの反応を行う。結合した抗体からの汚染物は問題とはならない。なぜなら放射能ラベルされていないからである。) これらの結果は、速やかな吸引工程時に、チップ上に保持された抗体が、複雑な混合物から特定の物質を効率的に捕捉していることを示している。

【0079】捕捉された物質をチップ膜から取り除い

て、これをさらなる検討に付すことができる。

【0080】チップ自体は、膜への吸着によって物質を非特異的に除去しない。

【0081】実施例 2

H e L a 細胞抽出物からの P 5 3 蛋白質の免疫沈降に対する膜誘導チップ (membrane derivatised tip) の使用

a) ナイロン膜を前方端部を横切った状態で取り付けて、前述のようにチップを作製した。(1) P 5 3 に対する精製モノクローナル抗体 (pAb 248)、または (2) アデノウイルス E 1 A, M 7 3 に対する精製抗体、を 100mM の炭酸塩緩衝液 (pH 9.0) 中に溶解して得られる溶液 $500\mu\text{l}$ にチップを浸漬することによって、抗体を膜の表面に付着させた。これを、 4°C で一晩保持した。過剰の溶液を除去し、リン酸塩緩衝液 (PBS) (pH 7.0) 中でチップを洗浄した。次いで、 $500\mu\text{l}$ の 3% BSA/PBS 中に室温で 30 分間浸漬することによって膜をブロックした。過剰のブロッキング剤を除去し、PBS 中で洗浄した後、チップを $1\text{m}\text{l}$ の H e L a 細胞溶解物中に浸漬した。

【0082】b) 約 10^7 個の H e L a 細胞を、 15mM の NaCl、 1% の NP 40、および 50mM の Trits を含んだ混合物 (pH 8.0) $2\text{m}\text{l}$ 中に 30 分間、氷上で溶解させた。液体を除去して、誘導チップと共にインキュベーションを行った。

【0083】c) チップと溶解物 (lysate) を氷上で 30 分間インキュベーションした後、過剰の溶解物を除去した。 $1\text{m}\text{l}$ の PBS をピペットチップ中に吸い上げ、そしてそれをピペットチップから膜を通して排出し、これを 3 回繰り返すことによってチップを洗浄した。次いで、 $40\mu\text{l}$ の Laemmli サンプルバッファ [2% の SDS, 10% のグリセロール, 100mM の DTT, 60mM の Trits (pH 6.8), 0.001% のプロモフェノールブルー] を含んだ試験管に各チップを加えた。サンプルを 2 分間沸騰させ、 $10\sim15\%$ のポリアクリルアミド/SDS ゲルの 3 つの別個のトラック上にロードした。

【0084】最初の 2 つのトラックは p 5 3 タンパク質の免疫沈降を示し、このときチップはアンチ-p 5 3 抗体 (pAb 248) で誘導された。トラック 3 (ネガティブコントロール) では、アンチ-E 1 A 抗体で誘導されたチップは、予測したような検出可能な蛋白質の免疫沈降を示さなかった。これは H e L a 細胞がアデノウイルス蛋白質を発現しないからである。

【0085】文献

1. Yewdell, J. W., Gannon, J. V. and Lane, D. P., J. Virol., (1986), 59, 444-452.
2. Harlow, E., Franz, B. R. and Schley, C., J. Virol., (19

85), 55, 553.

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のデバイスの好ましい態様の断面立面図である。

【図2】本発明のデバイスの好ましい態様の端面図である。

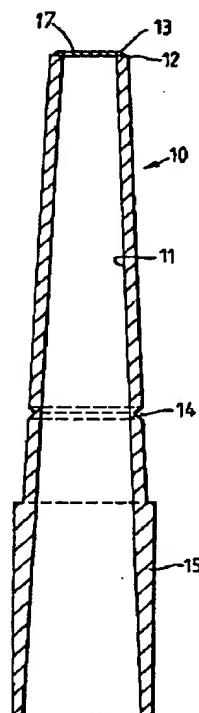
【図3】

【図4】

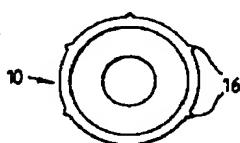
【図5】図3, 4, および5は、本発明による3つの異なるデバイスの、透視した側面断面図である。

【図6】本発明のデバイスをエッペンドルフチューブ中の所定の位置に配置したときの、透視した側面断面図である。

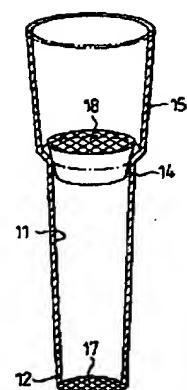
【図1】



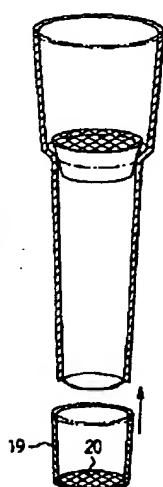
【図2】



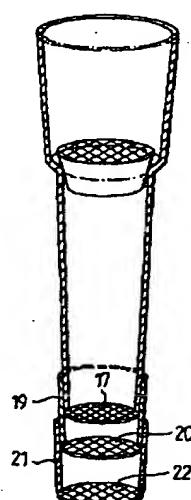
【図3】



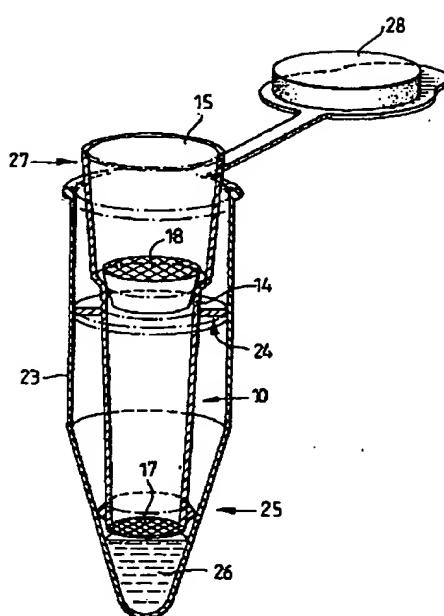
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
// B 0 1 D 63/08 8014-4D

(72)発明者 マーガレット・パトリシア・レイバック
イギリス国ウェールズ シーエフ7・9ジ
エイティー, ミッド・グラモーガン, ポン
ティクラン, タリガーン, フェアビュー
ハウス (番地なし)

(72)発明者 マイケル・ケネス・ケンリック
イギリス国ウェールズ シーエフ4・3ピ
ーキュー, カーディフ, ヒース, アレンズ
バンク・ロード 119

(72)発明者 デーヴィッド・アラン・パリー
イギリス国ロンドン ダブリュー5, アー
リング, ノースフィールズ・アベニュー
304, ナイアガラ・ハウス 1